

**Über die Phosphatide und Glykolipide
der Netzhaut
von Schweineaugen**

Peter Wolff

1966

Über die Phosphatide und Glykolipide der Netzhaut von Schweineaugen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Peter Wolff

aus

München

November 1960



Berichterstatter: Professor Dr. L. Hörhammer

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Dezember 1960

Über die Phosphatide und Glykolipide eines Netzhaut-Lipoidextraktes aus Schweineaugen, I

Von

L. Hörhammer, H. Wagner und P. Wolff

Aus dem Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München
Direktor: Prof. Dr. L. Hörhammer

(Der Schriftleitung zugegangen am 27. Dezember 1959)

Herrn Professor Dr. Dr. K. W. Merz, Freiburg, zum 60. Geburtstag gewidmet

Die Gesamtlipoidmenge der Rindernetzhaut beträgt etwa 2,3 bis 3,4% des Frischgewichtes und 20–30% des Trockengewichtes^{1–4}. Davon sollen nach Krause² die Phosphatide mit 70% den Hauptteil an den Netzhautlipoiden bilden, so daß man, um 1 g Rohphosphatide zu erhalten, rund 40 g Netzhäute oder 225 Rinderaugen benötigt.

Gefunden wurden bisher Lecithin, Kephalin, Sphingomyelin, Cerebrosid und Cholesterin. D'Asaro und Mitarbeiter⁴ ergänzen diese Angaben durch die Prozentwerte für Gesamtmenge an cholinhaltigen Phosphatiden (51%) und Fettsäuren (82%) und kommen zu der Feststellung, daß das Cholesterin nur in freier Form vorliegt. Andere Arbeiten beschäftigten sich mit der Frage der Lipoidverteilung in der Rindernetzhaut. So geben Collins und Mitarbeiter⁵ an, daß die Außenglieder der Sehzellen wesentlich mehr Phosphatide, etwa 30% ihres Trockengewichtes, enthalten als die Innenglieder. Dies wird von Francis⁶ durch histochemische Untersuchungen bestätigt, bei denen außerdem die Beobachtung gemacht wurde, daß sich die Ellipsoide durch einen hohen Lecithingehalt auszeichnen. Cholesterin soll hauptsächlich in der inneren Plexiformen-Schicht enthalten sein, während sich die Glykolipide bevorzugt in den Riesenzellen der Ganglienzellschicht nachweisen lassen.

Ausgangsmaterial für die vorliegenden Untersuchungen bildeten 40 g eines durch Aceton-Äther-Äthanol-Extraktion gewonnenen Gesamtlipoidextraktes aus den Netzhäuten von 9000 Schweineaugen, der uns von der Firma Etapharm, Wien, zur Verfügung gestellt wurde. Sein mittlerer Phosphatidgehalt betrug 78%.

¹ A. Cahn, diese Z. **5**, 213 [1881].

² A. C. Krause, Acta ophthalmol. [Copenhagen] **12**, 372 [1934].

³ P. J. Leinfelder u. P. W. Salit, Amer. J. Ophthalmol. **17**, 1619 [1934].

⁴ B. S. D'Asaro, R. G. Young u. H. H. Williams, A. M. A. Arch. Ophthalmol. **51**, 596 [1954].

⁵ F. D. Collins, R. M. Love u. R. A. Morton, Biochem. J. **51**, 669 [1952].

⁶ C. M. Francis, Med. Coll. Trivandrum India J. Comp. Neur. **103**, 355 [1955].

Der Extrakt wurde zunächst papierchromatographisch mit Hilfe von Testsubstanzen und durch Behandeln mit verschiedenen Lipoid-Färbereagenzien auf seine qualitative Zusammensetzung hin untersucht. Ohne Vorfraktionierung gelang damit auf einem mit Formaldehyd imprägnierten Papier⁷ im System Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5 aufsteigend der Nachweis von Phosphatidylethanol (Lecithin), Phosphatidyläthanolamin (Colaminkephalin), Phosphatidylserin (Serinkephalin) und Monophosphoinositid (Abb. 1). Bezüglich der Mengen-

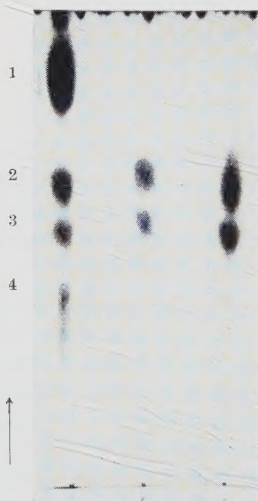


Abb. 1. Papierchromatogramm von Netzhautilipoidgesamtextrakt (links), Netzhautilipid-Folch-II-Fraktion (in der Mitte) und Phosphatidylserin-Monophosphoinositid-Gemisch aus Rinderhirn (rechts) in Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5; Anfärbereagenz: 0,1proz. Nilblaulösung.

- 1 = Phosphatidylethanol, Phosphatidyläthanolamin, Sphingomyelin-Cerebrosid-Gemisch;
- 2 = Phosphatidylserin;
- 3 = Monophosphoinositid;
- 4 = Gangliosid bzw. Diphosphoinositid.

Die Lösungsmittelfront ist auf dieser und den folgenden Abbildungen nicht sichtbar.

verhältnisse war bereits hieraus abzuleiten, daß der Lipidextrakt wesentlich mehr Phosphatidylserin als Monophosphoinositid enthielt und darin gut mit einem in gleicher Weise hergestellten Gehirnlipidextrakt übereinstimmt. Bekanntlich ist das Rinderhirn durch einen so geringen Gehalt an Monophosphoinositid ausgezeichnet, daß dieses lange Zeit dem Nachweis entgangen war und von uns erst mit Hilfe eines neuen papierchromatographischen Verfahrens sichtbar gemacht und anschließend durch hochstufige Craig-Verteilung isoliert werden konnte⁸. Die in dem Chromatogramm zusätzlich noch auftretenden Farbflecke im R_F -Bereich 0,35–0,38 waren, da Gangliosid und Diphosphoinositid in diesem System nur schwer unterschieden werden können, auf papierchromatographischem Wege allein nicht mehr zu charakterisieren. Der positive Neuraminsäuretest in einer aus frischen Netzhäuten gewonnenen ätherunlöslichen Fraktion und die weitere Aufarbeitung einer Folch-I-Fraktion ergaben aber, daß sowohl Gangliosid als auch Diphosphoinositid anwesend sein müssen. Allerdings dürfte der Gehalt an

⁷ L. Hörhammer, H. Wagner u. G. Richter, Biochem. Z. **331**, 155 [1959].

⁸ L. Hörhammer, H. Wagner u. J. Hölzl, Biochem. Z. **330**, 591 [1958].

beiden Verbindungen im Gesamtextrakt nicht mehr als 2% betragen. Ein Gehirngesamtlipoidextrakt besitzt, damit verglichen, einen mindestens fünf- bis zehnfach größeren Anteil an Diphosphoinositid. Nachdem die Netzhaut entwicklungsgeschichtlich der grauen Hirnsubstanz entspricht, diese aber im Gegensatz zur weißen Hirnsubstanz kein Diphosphoinositid enthält, kann man in dem äußerst geringen Diphosphoinositidgehalt der Netzhaut auch hinsichtlich der qualitativen Phosphatidzusammensetzung eine gewisse Analogie erkennen, wenn man zudem in Betracht zieht, daß die Präparation der Netzhaut sehr leicht zu einer Verunreinigung durch Teile des zur weißen Hirnsubstanz gehörigen Fasciculus opticus (Sehnerv) führen kann.

Zum Nachweis von Sphingomyelin und Cerebrosiden wurde der Gesamtlipoidextrakt nach McKibbin und Taylor⁹ alkalisch hydrolysiert und die Lösung nach dem Konzentrieren wiederum auf Formaldehyd-Chromatogrammpapier, diesmal im System 20 Tle. Pyridin/Butanol/Wasser 7:25:25 + 5 Tle. Dibutyläther¹⁰ chromatographiert. Wie aus Abb. 2 hervorgeht, herrscht Übereinstimmung mit den mitgelaufe-

Abb. 2. Papierchromatographie von synthet. Lecithin (links), Netzhautgesamt-lipoidextrakt nach Alkali-hydrolyse (in der Mitte) und Sphingomyelin aus Rinderhirn (rechts) im System: 20 Tle. Pyridin/Butanol/Wasser 7:25:25 + 5 Tle. Dibutyläther. Anfärbereagenz: 0,1proz. Nilblaulösung.

- 1 = Cerebrosidgemisch;
- 2 = Lecithin;
- 3 = Sphingomyelin.

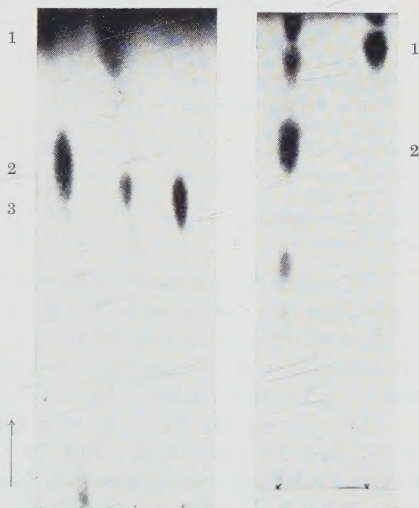


Abb. 2

Abb. 3

Abb. 3. Netzhautlipoidgesamtextrakt (links) und Cerebrosid aus Rinderhirn (rechts). Chromatographie wie bei Abb. 2 angegeben.

- 1 = Cerebrosid;
- 2 = Phosphatidylcholin-Phosphatidyläthanolamin, Sphingomyelin-gemisch.

nen Testsubstanzen Cerebrosid und Sphingomyelin aus Rinderhirn. Der Nachweis des Cerebrosids gelingt auch aus dem unbehandelten Extrakt (Abb. 3). Nicht entschieden werden konnte ohne weitere Fraktionierung, ob in der Netzhaut neben dem üblicherweise aus Kerasin, Phrenosin, Nervon und Oxyneron bestehenden Cerebrosidgemisch auch die analogen Schwefelsäureester vorkommen.

⁹ J. M. McKibbin u. W. E. Taylor, J. biol. Chemistry 178, 29 [1949].

¹⁰ L. Hörhammer, H. Wagner u. S. Wieland, in Vorbereitung.

Zur Ermittlung der quantitativen Zusammensetzung des Extraktes wurden Phosphor-, Stickstoff-, Cholin- und Galaktosebestimmungen durchgeführt. Den Gehalt an Monophosphoinositid, Phosphatidylserin und Colaminkephalin einschließlich der cholinhaltigen Phosphatide bestimmten wir zusätzlich in der Weise, daß wir den Gesamtlipoidextrakt nach dem oben erwähnten Verfahren (vgl. Abb. 1) durch absteigende Chromatographie auftrennten, die Chromatogramme mit Nilblaulösung anfärbten und die Flecke 1 (Lecithin, Colaminkephalin und Sphingomyelin), 2 (Phosphatidylserin) und 3 (Monophosphoinositid) nach Elution und Veraschung zur kolorimetrischen Phosphorbestimmung brachten. Der Cerebrosidgehalt errechnete sich aus der Differenz von freier und nach Hydrolyse gefundener Galaktosemenge. Da nur Spuren von Gangliosid im Extrakt enthalten sind, wird die tatsächliche Cerebrosidmenge etwas unter diesem Wert liegen. Der Anteil an Diphosphoinositid wurde nur durch den papierchromatographischen Vergleich mit einem Gehirnlipoidextrakt geschätzt. Die Tabelle zeigt die erhaltenen Werte.

Zusammensetzung des Gesamtlipoidextraktes aus der Schweinenetzhaut.

Substanz	%	Substanz	%
Cholinphosphatide (Lecithin u. Sphingomyelin) .	~39,0	Phosphatid- bzw. Glykolipidanteil (exp.)	~78,0
Colaminkephalin	~18,0	Cholesterin und Neutralfett	~22,0
Serinkephalin	~ 6,5	Gesamtfettsäuren	47,7
Monophosphoinositid . . .	~ 2,0	Gesättigte Fettsäuren . .	26,8
Cerebroside	~ 6,5	Ungesättigte Fettsäuren .	20,9
Diphosphoinositid	< 1,0	Unverseifbarer Anteil . .	10,7
Gangliosid	< 1,0		

Zusammengerechnet ergibt sich für den analysierten Extrakt einschließlich der Cerebroside ein Wert von 73% Phosphatid- und Glykolipidanteil (experimentell gef. 78%). Da man für den Neutralfett- und Cholesterinanteil 22% ermittelt, müssen in dem Extrakt noch andere bisher nicht identifizierte Verbindungen enthalten sein.

Der Anteil an Fettsäuren beträgt rund 48%. Davon entfallen 26,8% auf die gesättigten und 20,9 auf die ungesättigten Fettsäuren. Dieses Verhältnis verschiebt sich beim Phosphatidanteil zugunsten der ungesättigten Fettsäuren. Qualitativ ergaben die nach Alkaliisomerisierung aufgenommenen UV-Spektren der Gesamtfettsäuren (Abb. 4) und einer Fraktion mit vorwiegend ungesättigten Fettsäuren das Vorliegen von Dien-, Trien-, Tetraen-, Pentaen- und Hexaensäuren. Davon wurde der durch Tiefkühlkristallisation bei -70° erhaltene Anteil hochungesättigter Fettsäuren (Abb. 5) einer 110stufigen Craig-Verteilung im System Ameisensäure (85proz.)/Aceton (98proz.)/Benzin 1:6:8 unterworfen und eine Fraktion erhalten, die neben geringen Mengen Dien- und Triensäuren der C_{18} -Reihe auf Grund der bei 300, 315, 345 und 375 $m\mu$ auftretenden Maxima im UV-Spektrum nach der Alkaliisomerisierung die Hauptmenge an Tetraen-, Pentaen- und

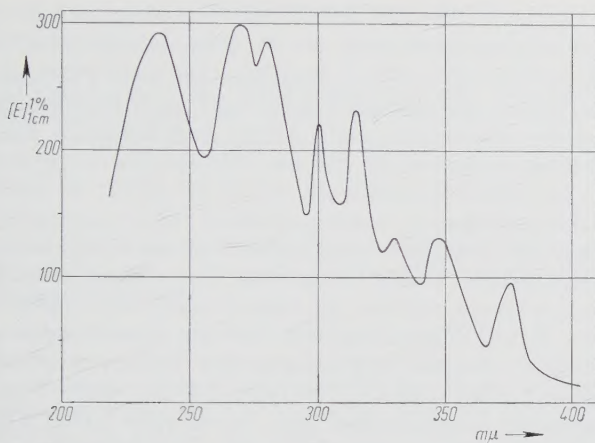


Abb. 4. UV-Spektrum der isomeren Gesamtfettsäuren aus dem Netzhaut-Gesamtlipoidextrakt.

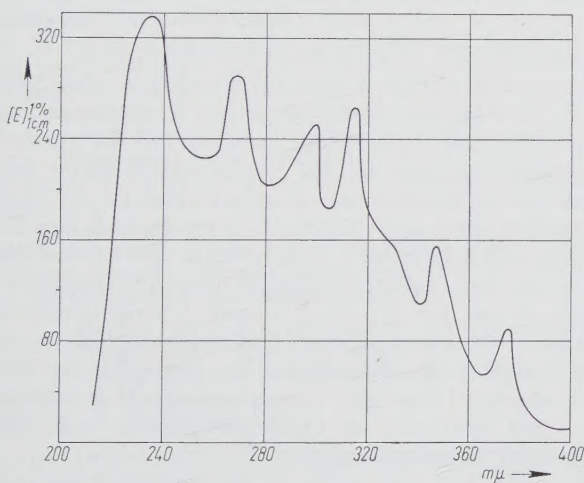


Abb. 5. UV-Spektrum der isomeren Fettsäuren der nach Tiefkühlkristallisation gewonnenen Fraktion VI.

Hexaensäuren enthielt. Die Hydrierung lieferte neben geringen Mengen Palmitinsäure Stearin-, Arachin- und Behensäure. Da sich das Fettsäuregemisch vor der Hydrierung papierchromatographisch und durch Craig-Verteilung nicht mehr weiter auftrennen ließ, muß es mindestens zu einem Großteil als sogenanntes kritisches Fettsäuregemisch vorgelegen haben, in dem die Tetraensäuren der C_{18} - oder C_{20} -Reihe, die Pentaensäuren der C_{20} - und die Hexaensäuren der C_{22} -Reihe

angehört haben könnten. Über die prozentuale Verteilung und Struktur der einzelnen Polyensäuren berichten wir in einer weiteren Mitteilung.

Um zu erfahren, in welchen Phosphatiden sich diese Polyensäuren bevorzugt finden, wurde der Gesamtlipoidextrakt nach Entfernung der Neutralfette und des Cholesterins auf Lecithin und Kephalin hin aufgearbeitet. Reines Lecithin wurde in einer Menge von 1,1 g isoliert. Auffallend war, daß dieses Lecithin als eine rein weiße, an der Luft sich nicht verändernde Substanz anfiel und einen relativ niedrigen Jodverbrauch aufwies. Der Fettsäureanteil bestand in der Hauptsache aus Stearin- und Palmitinsäure. Dieser Befund war etwas überraschend und ließ sich nur damit erklären, daß bei der Aufarbeitung, sehr wahrscheinlich schon bei der Extrakterstellung, ein Teil der ungesättigten Lecithine zerstört wurde*. Bei der Auftrennung der Rohkephalinfraktion erhielten wir 500 mg einer Folch-I-Fraktion, 400 mg einer Folch-II-Fraktion, 170 mg einer Folch-III-Fraktion, 10 mg einer Folch-V-Fraktion und nur 15 mg reinen Colaminkephalins mit einer Jodzahl von 45,0. Da Monophosphoinositid bisher nicht isoliert wurde, kann vorerst nur ausgesagt werden, daß sich die Hauptmenge der Polyensäuren im Kephalinanteil befindet. Die Zunahme der Jodzahl von Folch-I nach Folch-III und der Abfall von Folch-VI** wäre allerdings ein Hinweis dafür, daß diese im Serinkephalin lokalisiert sind.

Interessant war ein Vergleich der IR-Spektren des Netzhautlipoidextraktes mit solchen aus Rinderhirn und Rinderherzmuskel, da die Netzhaut einerseits ihrer Entstehung nach ein Teil der grauen Hirnsubstanz ist, andererseits aber in der Stoffwechselleistung mit dem Herzmuskel Ähnlichkeit besitzt. Der Kurvenverlauf im IR-Spektrum des Netzhautlipoidextraktes zeigt namentlich im Bereich der NH-CO-Valenz Schwingungen, bei 1280 cm^{-1} (Triglyceride und Cholesterin) und in der Intensität der für Cholinphosphatide und die trans-CH=CH-Gruppe typischen Bande bei 970 cm^{-1} bessere Übereinstimmung mit dem eines in gleicher Weise gewonnenen Herzmuskellipoidextraktes als mit einem Gehirnlipoidextrakt. Namentlich die Intensität der 970 cm^{-1} Bande läßt nach unseren bisherigen Untersuchungen¹¹ den Schluß zu, daß Herzmuskel und Netzhaut im Cholinphosphatid- bzw. Sphingolipidgehalt weitgehend übereinstimmen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für apparative Unterstützung, dem Fonds der Chemischen Industrie für Forschungsbeihilfen. Wir sind der Firma Etapharm, Wien, für die Bereitstellung der Extrakte und die damit verbundene großzügige Förderung der Arbeit zu besonderem Dank verpflichtet. Für Assistenz und photographische Arbeiten danken wir Fräulein H. Stegmüller und Fräulein E. Hörhammer. Die Infrarotspektren wurden von Herrn Dr. W. Steidle, Fa. Thomae, Biberach (Riß) aufgenommen, wofür wir gleichfalls herzlichst danken.

¹¹ L. Hörhammer u. H. Wagner, in Vorbereitung.

* Die Klärung dieser Anomalie wird zur Zeit durch Aufarbeitung frischer Netzhäute im eigenen Laboratorium versucht.

** Vgl. S. 16, Abschn. 10.

Beschreibung der Versuche

1. Ausgangsmaterial für alle Untersuchungen bildeten 40 g eines Netzhaut-Gesamtlipoidextraktes, der aus frischen Netzhäuten durch Aceton/Äther/Äthanol-Extraktion in der Kälte gewonnen wurde. Durchschnittsgewicht einer Netzhaut nach Präparation: 188 mg. Die Netzhäute wurden von Augen frisch geschlachteter Schweine präpariert und sofort weiterverarbeitet*. Das Einengen der Extrakte erfolgte im Vak. bei 25°. Sie wurden in einem Rundkolben unter Stickstoff aufbewahrt und kamen als solche zum Versand.

2. Prüfung auf Neuraminsäure nach Klenk und Langerbeins¹²: Sbst.: 250 g Netzhaut-Gesamtlipoidextrakt, 200 mg Gesamtphosphatide, 35 mg Ätherrückstand, $E = 0,56$ bei $d = 1$ cm; 0,045% Neuraminsäure; Messung im Zeiß-Spektralphotometer.

3. Quantitative Bestimmungen

a) Die Stickstoff-Bestimmung des Gesamt-Lipoidextraktes erfolgte nach einer modifizierten Mikro-Kjeldal-Methode der Firma Boehringer, Tutzing, mit 0,1*n* Borsäurelösung (für Puffergemische nach Sörensen, Merck Nr. 166) zur Beschickung der Vorlage mit einem Mischindikator, bestehend aus 2 Tln. einer 0,1proz. alkohol. Methylrotlösung und 1 Tl. einer 0,1proz. alkohol. Methylenblaulösung. Gef.: 1,24% (1,12%) N.

b) Der Phosphor-Gehalt des Gesamt-Lipoidextraktes wurde nach einer Vorschrift der Firma Boehringer, Tutzing, bestimmt. Messung im Zeiß-Spektralphotometer bei 580 m μ . Gef.: 2,23% (2,55%) P.

Die Bestimmung von P in Monophosphoinositid, Serinkephalin und Lecithin-Colaminkephalin-Sphingomyelin-Gemisch erfolgte nach papierchromatographischer Auftrennung des Gesamt-Lipoidextraktes auf Formaldehydpapier im System Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5 absteigend. Laufzeit 12—16 Stdn. Anfärbe-reagenz: 0,1proz. Nilblaulösung. Aufgetragene Extraktmengen: 200 γ , 1500 γ und 2500 γ . Zur Bestimmung kamen Fleck 1 der 200- γ -Auftragung, der Serin-Kephalin-Fleck 2 der 1500- γ -Auftragung und der Monophosphoinositid-Fleck der 2500- γ -Auftragung (vgl. Abb. 1). Die im Rechteck zu 5 $\times$ 2,5 cm bzw. 3 $\times$ 4 cm ausgeschnittenen Papierflecke wurden mit 5 ml Chloroform/Methanol 1:1 1 Stde. unter Rückfluß eluiert und nach Lowry und Mitarbeitern¹³ mit Perchlorsäure-Schwefel-säure-Gemisch verascht. Phosphatbestimmung nach Martin und Doty¹⁴. Messung bei 625 m μ im Zeiß-Spektralphotometer bei $d = 1$ cm; Verd. 5/2,5 ml.

Fleck 1 200 γ $E = 0,22$, entspr. 4,4 γ P = 56,8%*

Fleck 2 1500 γ $E = 0,20$, entspr. 4,0 γ P = 6,45%**

Fleck 3 2500 γ $E = 0,10$, entspr. 2,0 γ P = 2,10%*

* Mol.-Gew. für Berechnung = 800.

** Mol.-Gew. für Berechnung = 750.

c) Jodzählbestimmung nach dem Halbmikroverfahren von Kaufmann (D.G.F.† Einheitsmethode C-V 11c [53]). Gef.: JZ = 127,8 (114,0).

d) Cholinbestimmung nach Collins und Wheeldon¹⁵, modifiziert: Messung mit dem Zeiß-Spektralphotometer bei 630 m μ und $d = 1$ cm. Cholin-phosphomolybdat-Eichkurve: 0,32 mg = 0,20 E ; 0,60 mg = 0,915 E . Gef.: 4,92% Cholin.

¹² E. Klenk u. H. Langerbeins, diese Z. **270**, 185 [1941].

¹³ O. H. Lowry, N. R. Roberts, K. Y. Leiner, Mei-Ling Wu u. A. Farr, J. biol. Chemistry **207**, 1 [1954].

¹⁴ J. B. Martin u. D. M. Doty, Analytic. Chem. **21**, 965 [1949].

¹⁵ F. D. Collins u. L. W. Wheeldon, Biochem. J. **70**, 43 [1958].

* Industrieverfahren.

† Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft.

e) Galaktosebestimmung nach Mallow, McKibbin und Robb¹⁶: nach Hydrolyse gef.: 2,68% Gesamt-Galaktose; unhydrolysiert gef.: 1,18% freie Galaktose. Demnach Galaktose gebunden: 1,50%.

f) Plasmalbestimmung nach Feulgen und Mitarbeitern¹⁷, modifiziert nach Klenk: 0,1 ml (24,0 mg SbSt./25 ml Eisessig), $E = 0,24$ nach Hydrolyse, Verdünnung 1:6,5; 17,1% Gesamt-Plasmal. 0,1 ml (24,0 mg SbSt./25 ml Eisessig), $E = 0,17$ nicht hydrolysiert, Verdünnung 1:4; 7,45% freies Plasmal, demnach Plasmal gebunden: 9,65%.

g) Gesamt-Fettsäuren nach D.G.F.: gef. Mittelwert 47,79%. Gesättigte Fettsäuren nach D.G.F.-C-III 7 (53): 26,8%, demnach 20,99% ungesättigte Fettsäuren. Bestimmung des Unverseifbaren nach D.G.F.: gef. Mittelwert: 10,76%. Phosphatidbestimmung nach Bloor¹⁸: 502 (771) mg SbSt. in 5 ml Petroläther gelöst und mit dem 7fachen Überschuß an Aceton und 2 Tropfen einer gesätt. alkohol. Magnesiumchloridlösung versetzt. Nach 2stdg. Stehenlassen in der Kühltruhe und weiteren 24 Stdn. im Eisschrank wird dekantiert und der Rückstand über Schwefelsäure getrocknet. Auswaagen: 393 (602) mg, entspr. 78,2 (78,0) %.

4. Qualitative Papierchromatographie: Die Prüfung auf Esterphosphatide erfolgte auf- und absteigend im System Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5 nach Hörhammer und Mitarbeitern⁷. Die aufgetragenen in Chloroform gelösten Substanzmengen betrugen zwischen 100 und 200 γ . R_F -Werte nach der aufsteigenden Methode: Lecithin bzw. Colaminkephalin 0,79; Phosphatidylserin 0,57; Monophosphoinositid 0,48 und Gangliosid bzw. Diphosphoinositid 0,35–0,38. Zum Nachweis der Sphingolipide wurden entsprechende Extraktmengen (50–100 mg) nach McKibbin und Taylor⁹ mit 1*N* KOH 24 Stdn. bei 37° hydrolysiert, anschließend die Lösung neutralisiert und die Lösung nach Konzentrierung zur Chromatographie verwendet. Aufgetragene Mengen etwa 50–100 γ . Aufsteigende Chromatographie im System 20 Tle. Pyridin/Butanol/Wasser 7:25:25 + 5 Tle. Dibutyläther. Anfärbereagenzien: 1proz. Phosphomolybdänsäurelösung, 0,01proz. Rhodamin-B-Lösung und 0,1proz. Nilblaulösung. R_F -Werte: Synthet. Lecithin 0,64; Sphingomyelin aus Netzhaut und Rinderhirn 0,57; Cerebrosidgemisch aus Netzhaut und Rinderhirn 0,86–0,88.

5. Prüfung auf Anwesenheit von Diphosphoinositid nach Hölzl¹⁹: 2,6 g des Netzhaut-Gesamtlipoidextraktes wurden im System Petroläther (Sdp. 90–100°)/Methanol (99,5proz.) 3:2 im Scheidetrichter über 5 Stufen mit bewegter Unterphase verteilt (Ober- und Unterphase je 100 ml). In der gleichen Weise wurden etwa 0,5 g einer Folch-I-Fraktion behandelt. In der Unterphase von Glas 5 wurde durch Chromatographie auf Formaldehydpapier in Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5 ein P-haltiges Lipoid von R_F 0,38 nachgewiesen, das in Laufhöhe und seinem färberischen Verhalten mit dem früher beschriebenen Diphosphoinositid X_1 ²⁰ aus Rinderhirn übereinstimmt.

6. Fettsäureisomerisierung: 5 g des Netzhaut-Gesamtlipoidextraktes wurden nach Wintersberger²¹ mit 1,25 g Ascorbinsäure und einer zur Lösung ausreichenden Menge Kalilauge (15% KOH in 90proz. Methanol) 4 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Nach dem Verdünnen mit der doppelten Menge Wasser wird der unverseifbare Anteil 3mal mit gleichen Teilen Petroläther abgetrennt, die vereinigten Petrolätherauszüge einmal mit Wasser zurückgeschüttelt und anschließend

¹⁶ S. Mallow, J. M. McKibbin u. J. S. Robb, J. biol. Chemistry **201**, 825 [1953].

¹⁷ R. Feulgen, W. Boguth u. G. Andresen, diese Z. **287**, 90 [1951].

¹⁸ W. R. Bloor, J. biol. Chemistry **82**, 273 [1929].

¹⁹ L. Hörhammer, J. Hölzl u. H. Wiedemann, in Vorbereitung.

²⁰ L. Hörhammer, H. Wagner und J. Hölzl, Biochem. Z. **332**, 269 [1960].

²¹ L. Hörhammer, F. Winterberger u. H. Wagner, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. **292/64**, 545 [1959].

die Fettsäuren aus der wäßr.-methanol. Lösung, die mit verdünnter Salzsäure auf pH 2,0 angesäuert worden war, durch Ausschütteln mit gleichen Teilen peroxyd-freiem Äther gewonnen. Die äther. Auszüge wurden anschließend mit Wasser säurefrei gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet, der Äther abgedunstet und der Rückstand über Schwefelsäure getrocknet (Auswaage 4,20 g). Davon wurde 1 mg des Fettsäuregemisches nach einer Vorschrift von Holmann und Burr²² mit 1 ml einer 23proz. Kalilauge in Äthylenglykol 8 Min. bei 180° auf dem Paraffinbad erhitzt. Hiernach wird sofort abgekühlt, mit Methanol p.a. auf 50 ml verdünnt und gegen eine Blindlösung, die Glykol-Kalilauge enthielt und wie der Versuchsansatz behandelt worden war, im Zeiß-Spektralphotometer im Bereich von 220—400 $m\mu$ in Abständen von jeweils 5 $m\mu$ gemessen (s. Abb. 4).

Ebenfalls der alkalischen Isomerisierung wurden unterworfen 1 mg eines Fettsäuregemisches, das als VI. Fraktion durch Tiefkühlfractionierung in Anlehnung an die Methode von Debuch²³ in folgender Weise aus den Gesamtfettsäuren gewonnen wurde: Aufnahme des Fettsäuregemisches in 100 ml Aceton und Tiefkühlung

Frakt. I:	bei —20° auskrist.: 0,912 g, JZ = 13,4
Frakt. II:	bei —30° auskrist. nach 1 Tag: 0,134 g, JZ = 48,2
Frakt. III:	bei —30° auskrist. nach 2 Tagen: 0,172 g, JZ = 53,9
Frakt. IV:	bei —70° auskrist. nach 1 Tag: 0,502 g
Frakt. V:	bei —70° auskrist. nach 2 Tagen: 0,178 g
Frakt. VI:	bei —70° in Lösg.: 0,969 g, JZ = 154,0 (159,0)

7. Craig-Verteilung der Frakt. VI: Die Gesamtmenge der Frakt. VI (etwa 0,95 g gelbliches Öl) wurde in einer 200stufigen vollautomatischen Apparatur von F. A. v. Metzsch im System Ameisensäure (85 proz.)/Aceton (98 proz.)/Benzin (Sdp. 50,7°) 1:6:8 nach Wintersberger²¹ über 125 Stufen verteilt. Auf Grund orientierender Papierchromatographie in Eisessig auf paraffiniertem Papier nach Pokorný²⁴ und Spiteri²⁵ wurden die Elemente in 6 Fraktionen zusammengefaßt.

Elemente	0—40	oxydierte Verunreinigungen
Elemente	41—61	vermutlich ungesätt. Fettsäuren der C ₂₀ - und C ₂₂ -Reihe
Elemente	63—67	vermutlich Arachidonsäure und Fettsäuren der Elemente 41 bis 61
Elemente	68—83	wie Elemente 41—61 und 63—67 + Linolensäure
Elemente	85—101	vermutlich Arachidonsäure, Linolsäure, Linolensäure und Ölsäure
Elemente	102—125	Spuren Linolensäure, Linolsäure, Ölsäure und geringe Mengen einer ungesätt. C ₁₆ -Fettsäure

8. Untersuchung der Fettsäuren 41—61 der Craig-Verteilung: Die Elemente 41—61 ergaben nach dem Eindampfen 30 mg eines schwach gelb gefärbten Öls. Für die Fettsäureisomerisierung wurden 1,5 mg des über Schwefelsäure getrockneten Öls wie unter 6. beschrieben isomerisiert. Das Auftreten von Maxima bei 375, 345, 315 und 300 $m\mu$ ließ auf das Vorhandensein von Hexaen-, Pentaen- und Tetraensäuren schließen, wobei die Tetraensäuren und Pentaensäuren den Hauptteil ausmachen dürften. Die Hydrierung, durchgeführt mit 3 mg des Öls in 5 ml Eisessig (p.a. Merck) und 10 mg Platinoxid als Katalysator in einer geschlossenen Apparatur (Fa. Erich Eydam, Kiel) bei Atmosphärendruck ergab auf paraffiniertem Papier in Eisessig chromatographiert: Behensäure (R_F 0,05), Arachinsäure (R_F 0,10), Stearinsäure (R_F 0,16) und wenig Palmitinsäure (R_F 0,34).

9. Darstellung von Lecithin: 24 g Netzhaut-Gesamtlipoidextrakt wurden zur weitgehenden Abtrennung des Neutralfetts und Cholesterins in Anlehnung

²² R. T. Holman u. G. O. Burr, Arch. Biochemistry **19**, 474 [1948].

²³ H. Debuch, diese Z. **304**, 109 [1956].

²⁴ J. Pokorný, Naturwissenschaften **43**, 374 [1956].

²⁵ J. Spiteri, Bull. Soc. Chim. biol **36**, 1355 [1954].

an die Methode von Bloor¹⁸ (s. Abschn. 3g) in Petroläther gelöst und mit Aceton gefällt. Rückstand etwa 18 g Trockengewicht. Weitere Aufarbeitung nach Klenk und Gehrman²⁶. Nach Passage von 6 g Rohlecithin* durch eine Aluminiumoxydsäule (120 g Aluminiumoxyd Merck stand. nach Brockmann) erhielten wir 1,1 g einer weißen, nach Gefriertrocknung sich nicht verändernden Substanz, die laut Papierchromatogramm rein und nach IR-Spektrum frei von Sphingomyelin war. Gef.: 2,2% N; 3,56% (3,38%) P; JZ = 31,5.

10. Darstellung von Kephalinfraktionen: Die Aufarbeitung der Rohkephalinfraktion, erhalten nach Klenk und Gehrman²⁶, erfolgte nach der von Folch²⁷ für Rinderhirnkephalin angegebenen Vorschrift*. Es wurden erhalten:

Folch I: 505 mg, JZ = 82,1

Folch II: 423 mg, JZ = 93,6

Folch III: 177 mg, JZ = 92,2

Folch V: 10 mg, JZ = 87,6

Folch VI: 15 mg, JZ = 44,6

Als Folch VI bezeichnen wir die nach der V. Folch-Fraktion aus der zurückbleibenden Lösung mit Alkoholüberschuß erhaltene Nachfällung.

11. IR-Spektren der Gesamtlipoidextrakte von Netzhaut, Herzmuskel und Rinderhirn: Die zur Aufnahme verwendeten Extrakte wurden zuvor über Schwefelsäure getrocknet und in Methylenchlorid als Lösungsmittel gemessen. Konzentration für alle Extrakte: 60 mg/ml; $d = 0,2$ mm, Aufnahmegerät Perkin-Elmer.

Zusammenfassung

Ein Netzhaut-Gesamtlipoidextrakt aus Schweineaugen wurde qualitativ und quantitativ auf seinen Phosphatid- und Glykolipidgehalt hin analysiert. In seiner Zusammensetzung entspricht der Extrakt, auch was das Vorkommen von Tetraen-, Pentaen- und Hexaen-Fettsäuren betrifft, einem Lipoidextrakt aus Rinderhirn, wobei in dem fast völligen Fehlen von Diphosphoinositid in der Netzhaut eine Analogie zu der grauen Hirnsubstanz zu sehen ist. Die Analyse des isolierten Netzhaut-Lecithins und der Kephalin-Fraktionen ergab für den Kephalinanteil den höchsten Gehalt an Polyenfettsäuren.

Summary

A total lipid extract from pig eye retina was analysed qualitatively and quantitatively for phosphatides and glycolipids. The extract corresponds, in its composition and in the occurrence of tetraenoic, pentaenoic and hexaenoic acids, to a lipid extract from beef brain. An analogy to the gray substance of the brain may be seen in the almost total absence of diphosphoinositide in the retina. Analyses of the isolated lecithin of the retina and of the cephalin fraction showed the cephalin fraction to contain the highest level of polyenoic acids.

Prof. Dr. L. Hörhammer, Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre, München 2, Karlstr. 29.

²⁶ E. Klenk u. G. Gehrman, diese Z. **292**, 110 [1953].

²⁷ J. Folch, J. biol. Chemistry **146**, 35 [1942].

* Leider ging ein Teil der noch größere Mengen Lecithin und Colaminkephalin enthaltenden Nachfällungen verloren.

LEBENS LAUF

Am 2. Juli 1932 wurde ich als Sohn des Diplomingenieurs Werner Wolff und seiner Gattin Ilse, geb. Dax, in München geboren.

Nach vierjährigem Besuch der Volksschule in Karlsruhe, Holzhausen und Feldafing, erfolgte der Übertritt in die Oberschule Starnberg. In München besuchte ich das Maximiliansgymnasium, an dem ich im Juni 1952 die Reifeprüfung ablegte.

Die zweijährige Tätigkeit als Apotheker-Praktikant leistete ich in der Hof-Apotheke in Freising ab. Im September 1954 bestand ich die staatliche Vorprüfung in München. Im Wintersemester 1954 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität das Pharmaziestudium und legte im November 1958 das pharmazeutische Staatsexamen ab. Die Bestallung als Apotheker erhielt ich im November 1959.

Mit der vorliegenden Arbeit begann ich im November 1958 am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München, unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Ludwig Hörhammer.

